UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
Année 1962 - N° 493

Recherche d'un Test pour l'étude in vitro des substances actives sur la Biosynthèse des Protéines

(Travail du Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon)

THESE

PRÉSENTÉE A LA
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
et soutenue publiquement le 10 Octobre 1962
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
PAR

Bernard LAFAY

Né le 21 Janvier 1936 à SAINT-RAMBERT-EN-BUGEY (Ain)

Imp. Chrétien-Paviol - Lyon

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
Année 1962 - N° 493

Recherche d'un Test pour l'étude in vitro des substances actives sur la Biosynthèse des Protéines

(Travail du Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon)

THESE

PRÉSENTÉE A LA

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 10 Octobre 1962

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

PAR

Bernard LAFAY

Né le 21 Janvier 1936 à SAINT-RAMBERT-EN-BUGEY (Ain)

Imp. Chrétien-Paviol - Lyon

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550013_0037

FACULTE MIXTE DE MEDECINE

ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE: Doyen Honoraire
Membre de l'Institut

M. H. HERMANN : Doyen
Correspondant de l'Institut

MM. M. LEVRAT, Assesseur
L. REVOL, Assesseur

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

PROFESSEURS

MM. HERMANN	Physiologie A
CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique Biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique & Hygiène Mentale
ROCHET	Thérapeutique Chirurgicale & Chirurgie Opératoire
CHAMBON	Chimie Organique & Toxicologie
WERTHEIMER	Clinique Chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
FROMENT	Clinique & Prophylaxie Cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique Médicale C
ENSELME	Chimie Biologique & Médicale
MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
GUILLEMINET	Clinique de Chirurgie Orthopédique & de Chirurgie Infantile
REVOL	Pharmacie Galénique & Matière Mèdicale
POLLOSSON	Clinique Gynécologique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique Médicale A
SOHIER	Hygiène & Action Sanitaire & Sociale
DUCLOS	Clinique Stomatologique
BERNHEIM	Clinique Médicale Infantile & Hygiène du premier âge
JOURDAN	Biologie Médicale & Pharmacodynamie
NETIEN	Botanique & Cryptogamie
BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
BADINAND	Chimie Analytique Pharmaceutique
DREVON	Pharmacie Chimique & Pharmacologie
ROCHE	Médecine Légale & Déontologie
COUDERT	Parasitologie & Pathologie Exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie & d'Audio-Phonologie

MM.	PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
	THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie & Allergologie
	BRUN	Clinique de Pneumo-Phtisiologie
	CREYSSEL	Clinique Traumatologique des membres
	DARGENT	Cancérologie
	GUICHARD	Anatomie Pathologique
	GIRARD Paul	Pathologie Générale & Expérimentale
	LATARJET	Anatomie
	PEYCELON	Pathologie Chirurgicale
	GIRARD Marcel	Thérapeutique
	VACHON	Pathologie Médicale
	GALY	Physio-Pathologie des Voies Respiratoires
	KEHL	Histologie & Embryologie
	PAPILLON	Radiologie
	JEUNE	Clinique des Maladies Infectieuses
	GONIN	Hydrologie Thérapeutique, Climatologie & Ecologie Sociale
	MONNET	Bactériologie
	BANSSILLON	Physiologie & Pathologie Obstétricale
	CHATONNET	Physiologie B
	GUINET	Clinique des Maladies Endocrinologiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM.	BERGER	Physique Nucléair Appliquée à la Médecine
	DORCHE	Technologie Pharmaceutique
	CIER Jean-François	Physiologie
	BERTOYE	Bactériologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	ROMAN	Parasitologie
	CIER André	Pharmacie Chimique & Pharmacologie
	PERROT	Chimie Organique & Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

MEDECINE

MM.	FEROLDI	Anatomie Pathologique
	CREYSSEL Roger	Chimie Biologique & Médicale
	DUROUX Emile	Anatomie
	BRETTE René	Thérapeutique
	DUMONT Louis	Histologie
	THIVOLET Jean	Hygiène
	GARIN Jean-Paul	Parasitologie
	MORET Robert	Physique
	BOUCHET Alain	Anatomie
	TOMMASI Michel	Anatomie Pathologique
	RIFFAT Georges	Hygiène
	JOUVET Michel	Pathologie Expérimentale
	FAVRE-GILLY Jean	Hématologie

PHARMACIE

MM.	ODDOUX Lucien	Botanique & Cryptogamie
	MALLEIN René	Chimie Analytique
	GRAS Jean	Chimie Biologique
	PEYRIN Jean-Olivier	Physique

AGREGES EN EXERCICE

MM.	PONT Maurice	Médecine Générale
	VIGNON Georges	Médecine Générale
	REVOL Louis	Médecine Générale
	PLAUCHU Marcel	Médecine Générale
	TRAEGER Jules	Médecine Générale
	MARION Pierre	Chirurgie Générale
	MICHAUD Pierre	Chirurgie Générale
	JAUBERT-de-BEAUJEU Michel	Chirurgie Générale
	SAUTOT Jean	Chirurgie Générale
	GUILLEMIN Georges	Chirurgie Générale
	BURTHIAULT René	Obstétrique
	GIGNOUX Marcel	Oto-Rhino-Laryngologie
	FRANCOIS René	Pédiatrie
	FREIDEL Charles	Stomatologie
	DEVIC Michel	Médecine Générale
	DESPIERRES Charles	Médecine Générale
	DE MOURGUES Georges	Chirurgie Générale
	FRANCILLON Jacques	Chirurgie Générale
	SAUBIER Eugène	Chirurgie Générale
	COLOMB Daniel	Dermatologie
	COLIN Marcel	Médecine Légale
	TOLOT François	Médecine du Travail
	GUYOTAT Jean	Neuro-Psychiatrie
	SCHOTT Bernard	Neuro-psychiatrie
	DUMONT Martial	Obstétrique
	BONAMOUR Georges	Ophtalmologie
	DURAND Louis	Urologie
	GARDE Alexandre	Médecine Générale
	PERRIN André	Médecine Générale
	LARBRE François	Médecine Générale
	MORNEX René	Médecine Générale
	NORMAND Jean	Médecine Générale
	MARET Gilbert	Chirurgie Générale
	DESCOTES Jacques	Chirurgie Générale
	CHASSARD Jean-Louis	Electro-radiologie
	ALLEGRE Georges	Neuro-Chirurgie
	HUGONNIER René	Ophtalmologie
	FAYSSE Robert	Orthopédie
	GAILLARD Jean	Oto-Rhino-Laryngologie
	KALB Jean-Claude	Pneumo-Phtisiologie

EXAMINATEURS DE LA THESE :

MM. ENSELME : Président,
DORCHE
PERRIN A.
PEYRIN J.O.

A MES PARENTS,

A MA FEMME,

A MES ENFANTS,

A MES BEAUX-PARENTS.

A Monsieur le Professeur ENSELME,

Il nous a proposé ce travail.
Ses conseils et ses suggestions nous ont toujours été profitables.
Nous lui en sommes reconnaissants.
Qu'il soit assuré de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur J. DORCHE,

Nous avons toujours apprécié sa compréhension et sa délicatesse.

A Monsieur le Professeur Agrégé A.PERRIN,

A Monsieur le Professeur J.O. PEYRIN,

Ils nous ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, nous leur adressons nos respectueux remerciements.

A Monsieur le Professeur SOHIER,

Nous le remercions vivement de l'accueil réservé dans son Laboratoire.

A Monsieur le Professeur BERGER,

qui nous a guidés dans l'étude physique de nos recherches, ce dont nous lui sommes très reconnaissants.

A Monsieur le Docteur HENRY,
Chef de Travaux de Chimie Biologique,

Nous tenons à le remercier pour les directives qu'il nous a données, particulièrement en ce qui concerne l'installation et la manipulation des substances marquées.

A Nos Maîtres de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon,

A Nos Maîtres et camarades d'Internat.

- I N T R O D U C T I O N -

Nous proposons ici un test pharmacodynamique permettant de juger de l'effet produit par un corps sur la synthèse des protéines.

Après un bref rappel des notions couramment admises actuellement sur la synthèse protéique,

nous exposerons dans une deuxième partie les différentes techniques d'incubation in vitro utilisées jusqu'ici; nous donnerons le détail de la technique utilisée au laboratoire dans un troisième chapitre,

et nous terminerons dans un quatrième chapitre par les résultats obtenus avec divers composés tels que: phosphate de pyridoxal,
thyroxine,
glutathion

- CHAPITRE I -

A - NOTIONS COURAMMENT ADMISES QUANT A LA SYNTHESE PROTEIQUE -

1°/- Bref historique :

L'étude de la synthèse protéique est extrêmement vaste, étant donné:

a)- la complexité des macromolécules protéiques,

b)- l'imbrication étroite des différents problèmes étudiés (il ne suffit pas de voir l'enchaînement des réactions par l'intermédiaire des enzymes; ces enzymes, pour la plupart de nature protéique, sont aussi synthétisés; et comment ?).

Dans l'étude de la synthèse protéique, les méthodes nutritionnelles et la plasmaphérèse (36) cédèrent rapidement le pas aux méthodes isotopiques, utilisées dès le début par SCHOENHEINER et Coll. dans une série classique d'expériences relatives au turnover protéique.

Les réels progrès apparurent dès 1947 et de très nombreux auteurs font maintenant le point de la synthèse protéique.

RAACKE (54); KRUH J. (36) (37); BERG P. (6); HOAGLAND (26); COHEN G.M et CROSS F. (10);LOFTFIELD R.B (45); CHANTRENNE

2°/- Schéma général de la synthèse protéique :

La grande majorité des auteurs admettent le schéma général suivant:

a)- Activation des acides aminés :

adénosine triphosphate (A.T.P.) + acide aminé* (AA*) + enzyme soluble (E)

$$\rightleftarrows E - (AMP - AA^*) + PP \text{ (pyrophosphate)}$$

b)- Transfert des acides aminés activés sur l'acide ribonucléique soluble (RNAs)

$$E.(AMP - AA) + RNAs \rightleftarrows RNAs - AA + AMP + PP$$

AMP = adénosine monophosphate

c)- Intégration du composé acide ribonucléique soluble - acide aminé marqué (RNAs - AA*) dans les particules structurales.

RNAs - AA* + microsomes + CTP ⟶ incorporation des acides aminés dans la protéine.

Quelques auteurs ne sont pas d'accord pour admettre dans tous les cas de biosynthèse ces trois stades, soit dans leur succession, soit dans leur ensemble. Ainsi, BELJANSKI et OCHOA (4 - 2), pensent que l'activation des acides aminés et l'action de l'acide ribonucléique soluble ne sont pas indispensables; un enzyme d'incorporation peut remplacer le système E.pH5 pour stimuler l'incorporation d'acides aminés dans les microsomes des protéines de foie de rat.

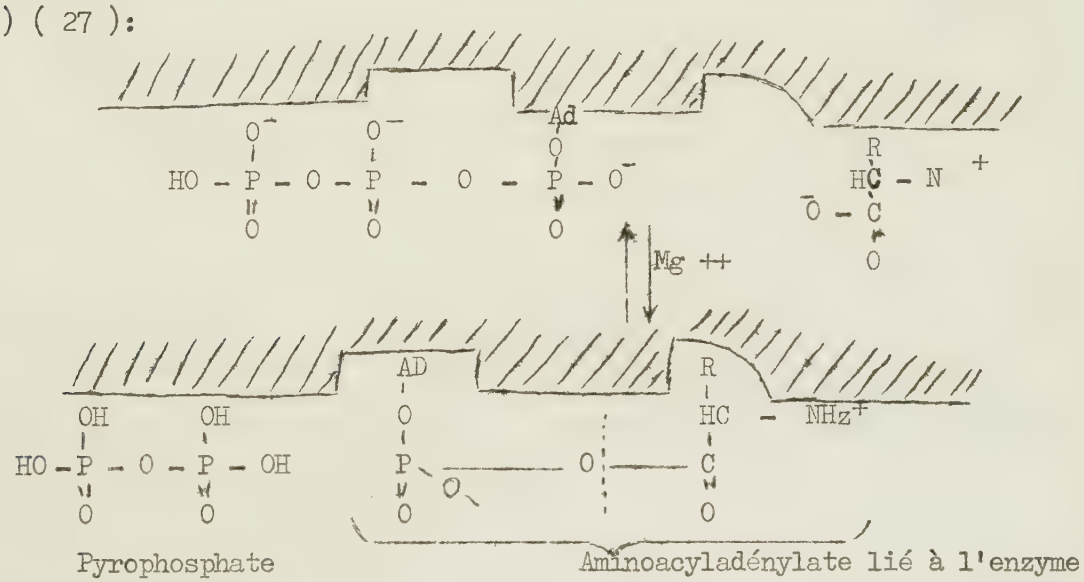
Mais ce schéma n'en a pas moins l'intérêt de fractionner le processus général de la synthèse protéique et de permettre aux chercheurs de l'étudier à tel ou tel stade.

B - ETUDE DE L'ACTIVATION DES ACIDES AMINES -

1°/- Schéma de la réaction d'activation : cette activation se réalise grâce à l'A.T.P. et l'E. pH5 : (enzyme extrait à partir du foie de rat; cf 2ème partie).

Dès 1941, LIPMANN (40) avait émis l'hypothèse que l'énergie du type anhydrides-phosphates devait être utilisée pour activer le groupe carboxyl des acides aminés.

Voici la représentation classique actuelle de cette réaction (25) (26) (27):



Représentation schématique de l'activation des carboxiles d'amino-acides par ATP et enzyme d'activation; Ad = adénosine

La ligne pointillé indique le lieu de rupture du composé; et l'on peut constater que l'oxygène de l'acide aminé reste après la rupture sur la fraction nucléotidique. Cela a été vérifié avec l'oxygène marqué 18 O*.

2°/- Caractères de l'aminoacyladénylate (40) (42) :

a)- C'est un anhydride mixte (acide aminé-acide phosphorique) qui peut être préparé par voie biologique selon la méthode de LIPMANN et TUTTLE (42)

phosphate + ac. pyruvique $\xrightarrow{\text{lactobac. Delbrueckii}}$ acylphosphate

que l'on peut doser colorimétriquement après transformation de l'acylphosphate en acide hydroxamique sous l'action de l'hydroxylamine et action du perchlorure de fer qui donne un composé pourpre.

b) - Un bien meilleur rendement est obtenu par synthèse chimique, selon les méthodes de :

- DE MOSS et Coll. (17) : action des chlorures d'amino acides sur les sels d'argent d'AMP.
- BERG P. (6) : réaction équimoléculaire d'acide aminé et d'AMP avec le N, N' dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence de pyridine.
- Mc CORCODALE et Coll.(13): condensation du benzylmercaptoformyl acide aminé avec AMP.
- MOLDAVE et Coll. (47) : à partir du carbobenzoxyaminoacide

c)- Cet anhydride mixte très riche en énergie, se caractèrise par une grande instabilité:

- Il réagit spontanément avec l'azote de l'imidazole,
  avec l'amoniaque,
  avec les groupements thiol,
  avec les hydroxyles du ribose,
  avec l'hydroxylamine,
  avec les groupements aminés

des autres acides aminés en donnant des peptides, mais ces réactions ne sont pas physiologiques, et sont liées au hasard.

3°/- L'enzyme d'activation :

a)- peut s'obtenir à partir des végétaux, des bactéries, des tissus de mammifères.

L'enzyme que nous allons utilisé appelé enzyme pH5, a été obtenu à partir des foies de jeunes rats, par précipitation à pH5.

Cette fraction contient:

. un enzyme activant les acides aminés,

. d'autres enzymes solubles,

. des acides ribonucléiques solubles.

b)- Le rôle de cet enzyme est double :

- il favorise la synthèse de l'aminoacyladénylate en donnant un "enzyme-aminoacyladénylate": E (AMP - AA).

Ce composé est plus stable et moins réactif.

- Il dirige l'aminoacyladénylate vers des synthèses biologiques ordonnées.

c)- Ce stade de l'activation des acides aminés par l'enzyme et l'ATP a été étudié à l'aide :

- du pyrophosphate marqué (^{32} PP) (25) (27).

Si on met du ^{32}PP en présence d'ATP, de chlorure de magnésium et d'enzyme pH5, on obtient de l'ATP* marqué au phosphore 32 entre autres produits de la réaction.

$$^{32}PP + ATP + \text{enzyme pH5} + Mg\ Cl2 \longrightarrow {}^{32}ATP + {}^{32}PP$$

- de l'hydroxylamine qui donne un hydroxamate (25) (27), suivant la réaction :

$$E\ (\ AMP - AA^{*}) + NH2OH \rightleftharpoons E + AA - NHOH + AMP$$

La contrepartie naturelle de l'hydroxylamine peut être le groupement aminé des acides dans les chaînes peptidiques des microsomes.

d)- Les ions Mg ++ et les ions divalents en général, activent la réaction.

e)- Les preuves de cette activité synthétisante ont été obtenues par :

- oxygène marqué (18 O*) qui, au début, marque l'acide aminé et se retrouve en fin de réaction, sur l'AMP.

- par l'isolement des composés E (AMP - AA) tels tryptophanyladénylate, lors de la synthèse du tryptophane (30) (15) à partir d'homogénats de pancréas de boeuf.

f)- A chaque acide aminé correspondent un enzyme et un système activateur spécifiques: BERG P. (6) (54), car les actions des divers acides aminés sont additives.

g)- La répartition de ces enzymes pH5 est très vaste:

- elle a été étudiée au niveau de la cellule (34) (44), par des expériences d'incorporation in vivo.

La mesure de la radioactivité montra que l'incorporation est maximum au niveau des microsomes:

Mitochondries	: 15	cpm/mg
Surnageant	: 20	"
Microsomes	: 95	"

- dans les tissus de mammifères, l'enzyme se trouve (54) dans : le foie, le pancréas, la rate, les reins, le coeur, les muscles, les viscères, les réticulocytes, le thymus, les tumeurs, les oeufs non embryonnés.

- Cet enzyme est aussi présent chez les bactéries, les micro-organismes (E. COLI), les protozoaires et les végétaux.

h)- Les enzymes sont différemment concentrés dans un tissu considéré en fonction des teneurs en acides aminés; et cela, en raison de leur absorption cellulaire des acides aminés; laquelle est sous la dépendance de très nombreux facteurs (12).

i)- Les D isomères des acides aminés sont rejetés et ne participent pas à la synthèse protéique. Il n'y a pas de compétition entre les différents acides aminés (69).

C - TRANSFERT DES ACIDES AMINES ACTIVES SUR L'ACIDE RIBONUCLEIQUE SOLUBLE -

1°/- Schéma de la réaction :

Le complexe enzyme - aminoacyladénylate va rougir sur les acides ribonucléiques solubles pour donner une liaison de l'acide aminé avec l'acide ribonucléique soluble. Les autres produits de la réaction seront l'adénosine-monophosphate et le pyrophosphate:

$$E.\ (\ AMP - AA\ ) + RNAs \rightleftharpoons RNAs - AA + AMP + PP$$

2°/- Caractères des chaînes RNAs acceptrices :

a)- Origine et composition : ces chaînes RNAs acceptrices sont contenues dans la fraction E pH5. Elles sont composées de 75 à 100 nucléotides par chaîne, ce qui leur confère un poids moléculaire de l'ordre de 35.000 déterminé à partir des coefficients de sédimentation.

b)- Séquence des acides aminés : toutes les préparations de RNAs étudiées jusqu'à présent ont montré (59) :

- une extrémité terminale acceptrice composée ainsi :

  adényl 5' - 3' cytidylyl 5' - 3' cytidylyl 5' - 3' adénylyl-

- l'autre extrémité terminale non acceptrice composée ainsi:

  guanosine 5' monophosphate.

- le corps central de la molécule d'ARNs est donc porteur de la spécificité de l'ARNs pour tel amino acide.

On peut adopter la représentation schématique suivante des chaînes RNAs acceptrices:

adényl 5' - 3' Cytidylyl 5' - 3' Cytidylyl 5' - 3' adénylyl-

(corps de la molécule) - guanosine 5' monophosphate.

c)- Liaison des acides aminés : les acides aminés vont se fixer sur la chaîne terminale acceptrice par une liaison ester entre le carboxyl de l'acide aminé et un hydroxyl en 2' ou 3' du ribose d'un résidu d'acide adénylique terminal.

d)- Méthodes de préparations de RNAsAA : HOAGLAND (29) l'extrait des mixtures d'incubation usuelle par le chlorure de sodium à 10 % à 100° pendant 3 heures, d'où il le précipite par l'éthanol à - 10°.

La purification a eu lieu par redissolution dans l'eau et reprécipitation successives par l'éthanol. Le rendement est bon et permet l'extraction de 30 à 35 % des ARNsAA* présents dans les mixtures d'incubation.

e) Les propriétés chimiques du composé RNAs - AA sont résumées dans le tableau suivant (26) dû à HOAGLAND :

Traitement	Effet sur la liaison RNAsAA	Effet sur la réactivité de RNAs avec les AA
Dialyse contre eau sel-urée (29)	pas	———
Ninhydrine-CO^2 (29)	pas	———
Hydroxylamine (29)	Formation d'un hydroxamate d'AA	———
pH3-6	pas	pas
0,1 N HCl	pas	prévenu
pH 10, KH CO3	50 % hydrolysé en 8 minutes à 37° C.	pas
Périodate	———	prévenu
0,05 N HCl	hydrolysé en 15 minutes à 100° C	———
Incubation avec ribonucléase	hydrolyse rapide	———
Incubation avec désoxyribonucléase	pas	———
Incubation avec phosphomonoestérase	pas	pas
Incubation avec phosphodiestérase	hydrolyse	———

D - INTEGRATION DES ACIDES AMINES DANS LES PARTICULES STRUCTURALES -

1°/- Schéma de la réaction :

ATP et système générateur d'ATP

RNAs - aa + nucléoprotéines + ATP → Incorporation des AA + RNAs dans la protéine
des particules structurales

E. soluble
E. pH5

2°/- Les particules structurales : les particules structurales qui interviennent dans cette réaction peuvent provenir des noyaux cellulaires, des mitochondries ou des microsomes.

a)- L'incorporation des acides aminés dans les protéines des noyaux cellulaires, a été étudiée par de nombreux auteurs, dont SCHNEIDER (57), lequel utilisa pour matériel du foie de rat.

Dans ce cas, les ions Na+ sont nécessaires, alors que le système microsomal requiert la présence d'ions K+, l'incorporation semble être ici dépendante d'une synthèse préliminaire de RNA et d'ARN nucléaire serait séparable en deux parties (31).
L'activité synthétisante des noyaux dure une à deux heures.

b)- Les mitochondries par contre, jouissent d'un rôle plus important; elles se trouvent dans le culot de centrifugation à 10.000g. du surnageant à 500g. d'un homogénat de foie.
Dans les tissus animaux, elles incorporent environ deux fois plus que les noyaux, mais cinq fois moins que les microsomes. L'incorporation dure dans ce cas une vingtaine de minutes. Les ions Mg++ et l'ATP sont nécessaires.

c)- Les microsomes prennent une part importante à la synthèse protéique. Il convient, dans un but de clarification, de préciser la terminologie employée.

La nomenclature est très variée.

Les microsomes sont la fraction isolée des extraits tissulaires par centrifugation du surnageant mitochondrial à 100.000g. pendant une heure.

L'ancienne dénomination de "petits granules" est maintenant périmée.
L'analyse chimique des microsomes montre qu'ils sont composés de :

- RNA : 10 à 15 %
- Phospholipides : plus de 20 %
- Protéines.

Pour ce qui est de leur morphologie, ils consistent en des vésicules closes, sur la membrane desquelles sont fixées des particules denses.

" Les particules microsomales" ou particules microsomales microsomiques" sont les particules denses, riches en électrons, accrochées in vitro aux microsomes.
Elles s'obtiennent par traitement des microsomes par le désoxycholate de sodium (44)
Elles comprenent 15 % des protéines des microsomes entiers et 80 % de leur RNA.
Ce sont de petites particules sphériques de 100 à 250 A.
D'après les études de LITTLEFIELD et Coll. (44):

" Les particules ribonucléiques" ou "ribosomes" ou "particules post-microsomales" sont obtenues par centrifugation prolongée du surnageant microsomal.

Le terme de "fraction microsomale" se rapporte aux préparations brutes en général.

d)- Composition des microsomes :

Malgré leur grande diversité d'origine, il existe une remarquable similitude de composition qualitative entre les microsomes.

Les pourcentages de RNA varient de 30 % (grain de blé) à 65 % (E. COLI).

de protéines 35 % (E. COLI) à 55 % (foie de rat 44) et de même 70 % (grain de blé).

de phospholipides sont de l'ordre de 5 à 10 % (foie de rat).

e)- Fractionnement des microsomes :

- Les acides nucléiques peuvent être extraits des microsomes par le désoxycholate de sodium (44) ou par le lubrol (détergent non ionique) selon la méthode de COHN.

SIMKIN et WORK ont fractionné les constituants des microsomes par des solutions de ClNa.

-L'extraction par le désoxycholate dénature les protéines. GILLCHRIEST et BOCK réussirent à les obtenir sans les dénaturer, par une méthode utilisant l'acide perchlorique. Ils dressèrent à la suite de cela une table des compositions en acides aminés des différentes protéines microsomales, qui permet de constater une très faible proportion de cystine et de cystéine.

- La partie insoluble de l'extraction par le désoxycholate est particulièrement riche en RNA et incorpore très rapidement les acides aminés. Le rapport RNA/protéine obtenu par un tel fractionnement, approche de 1 (44) et semble contenir tous les acides ribonucléiques des microsomes.

3°/- Cinétique de la réaction : de très nombreux auteurs ont travaillé sur cette réaction, dont LITTLEFIELD et Coll. (43), TAKANAMI et Coll. (61 - 62), PETERMAN et HAMILTON (51), WONG, GROSSI, MOLDAVE (63 - 21) et DECKEN (16).

Selon HOAGLAND (26), le GTP est nécessaire à la réaction. Selon d'autres, l'ATP est essentiel, et GTP est un système générateur d'ATP sont nécessaires pour obtenir un marquage maximum.

L'énergie nécessaire à l'élaboration des liaisons peptidiques des acides aminés avec la protéine est apportée par l'ATP ainsi que par l'énergie de clivage des composés RNA - AA .
Mais si l'on met en présence dans un milieu d'incubation: microsomes, ATP, GTP et système générateur d'ATP, l'incorporation restera faible; l'action des enzymes solubles est nécessaire pour avoir une bonne incorporation (44 - 62). GROSSI et MOLDAVE (21) réalisèrent l'expérience suivante qui illustre cela. Dans une mixture d'incubation contenant:

- RNA - AA* marqué
- des microsomes
- ATP

- GTP
- Acide phosphoénol pyruvique
- de la kinase pyruvique

ils ajoutèrent du surnageant de la centrifugation à 102.000g. d'un homogénat de foie de rat. L'incorporation fut de 75 cpm/mg. Ils ajoutèrent à une mixture identique de l'enzyme pH5. L'incorporation fut de 32 cpm. Dans une troisième incubation, ils ajoutèrent du surnageant de précipitation de l'enzyme pH5, lequel contient les enzymes solubles, l'incorporation fut de 112 cpm/mg. de protéine.

Ces enzymes solubles se trouveraient donc dans le surnageant de centrifugation après précipitation de l'E. pH5; on les appelle parfois "transfening enzymes".

Selon DECKEN et HULTIN (16) la fraction obtenue à pH5 est plus efficace que le surnageant pH5 : 67 cpm/mg contre 34.

Quoiqu'il en soit, s'il existe des divergences dans les divergences dans les affirmations de ces différents auteurs, elles sont minimes. Le rendement de la réaction se trouve aux environs de 20 % (ce chiffre de 20 % correspondant au % d'acides aminés incorporés dans la protéine, par rapport aux acides aminés introduits).

4°/- Processus d'incorporation :

a)- Type de liaison des AA sur la protéine :

- RNAs - AA joue le rôle de "petit gabarit". Après avoir transporté l'AA à la protéine; RNAs et libéré et peut rentrer dans un autre cycle.

- C'est un adapteur spécifique qui intègre à un endroit déterminé du gros polymère microsomal de RNA.

-Les AA sont liés à la protéine par des liaisons peptidiques.

- RNA pourrait porter aussi des informations pour spécifier la structure protéique (6 - 12).

Si des complexes entre RNAs - AA et RNA microsomal existent, ils sont, soit instables, soit à des concentrations très faibles, car ils n'ont jamais été isolés.

Les ribonucléoprotéines microsomales sont dites "les gros gabarits". Elles sont constituées de gros polymères de RNA, donc stables, et dont l'ordre linéaire des bases nucléotidiques détermine la séquence finale des AA.

b)- Spécificité :

Selon l'hypothèse de CRICK (14) elles joueraient le rôle de moules dans la synthèse protéique;

Selon BERG et GIERER (6 - 7), le processus de liaison terminal est spécifique. DNA serait le transporteur génétique d'information pour la spécification de la structure protéique.

Cette théorie semble maintenant admise; car elle explique la continuité génétique, alors que l'ancienne théorie selon laquelle les AA libres réagiraient et se fixeraient directement sur le gabarit final par des liaisons de covalence ne l'explique pas.

E - FORMATION DE LA STRUCTURE PROTEIQUE :

Les mécanismes précédents aboutissent à la formation de polypeptides, lesquels sont encore très loin de la structure protéique. Ces polypeptides vont se plier, s'associer, des ponts disulfure vont se créer, si bien que la molécule protéique n'aura plus rien à voir avec le ou les polypeptides qui lui ont donné naissance.

1°/- Pliage des polypeptides :

Une fois les acides aminés intégrés selon un ordre bien défini dans le polypeptide, ce dernier se plie d'une façon spécifique; des liaisons hydrogènes s'établissent, certaines régions de polypeptide se tordent en hélices. Mais ces hélices ne sont pas toujours régulières; le pliage se réalise parfois d'une façon très intriquée, ainsi que le montre la structure de la myoglobine établie récemment par KENDREW.

Actuellement, le pliage des molécules est considéré comme un phénomène spontané, lequel est déterminé par la séquence des acides aminés, et par les conditions physico-chimiques existant au sein de la cellule. La réversibilité des faibles dénaturations est en faveur de cela.

2°/- Les ponts disulfure :

On ne sait encore pas si la formation de ces ponts se réalise par oxydation enzymatique spécifique; l'oxydo-réduction des groupements -SH entre

eux est encore obscure.

3°/- Association des polypeptides :

Les propriétés physiologiques des protéines dépendent de l'association des polypeptides entre eux.

Ces associations se réalisent spontanément in vitro, PERUTZ l'a montré pour l'association des chaînes α et β de la globine.

F - RELATIONS ENTRE LA SYNTHESE PROTEIQUE ET LE METABOLISME DES LIPIDES :

Les particules microsomales sont attachées aux membranes très riches en lipides du réticulum endoplasmique.

Une corrélation existe entre l'aptitude à la sécrétion des cellules et la teneur en lipoprotéines des membranes cellulaires.

HENDLER a montré que dans l'oviducte de poule, aussi bien in vitro qu'in vivo, les acides aminés radioactifs peuvent être rapidement incorporés dans la fraction lipidique.

Cette fraction se comporterait comme un précurseur dans le marquage des protéines de préférence aux acides aminés libres.
Les relations de ces composés avec la synthèse protéique sont encore mal connues, mais ils ouvrent certainement d'intéressantes possibilités. Il est en effet possible que les phospholipides dérivés du glycérol puissent servir de transporteurs d'acides mainés, de la même façon que les acides ribonucléiques le sont par les hydroxiles de ribose.

C O N C L U S I O N:

Chaque stade de la synthèse protéique a fait l'objet de très nombreuses expérimentations, surtout ces dernières années; les découvertes ont été faites parfois simultanément, de très nombreux chercheurs s'attaquèrent au même problème; et il est encourageant de voir que par des voies différentes, les résultats ont souvent été identiques, et si les auteurs arrivent parfois à des conclusions différentes, c'est probablement par le fait que plusieurs voies de

biosynthèse des protéines existent, mais sont encore ignorées ou très mal connues.

Beaucoup de points ne sont pas encore élucidés. L'étude de la biosynthèse des protéines n'en est encore qu'à son début; mais, néanmoins, le schéma général que nous avons présenté ici se borne à regrouper les points admis par la majorité des chercheurs quant à cette voie d'incorporation, et nous permettra de mieux comprendre les différents systèmes d'incorporation in vitro qui s'y rapportent.

- CHAPITRE II -

LES SYSTEMES ET LES TECHNIQUES D'INCORPORATION DES ACIDES AMINES

A - GENERALITES : Nous ne nous attarderons pas ici à l'étude des méthodes d'incorporation des AA in vivo, lesquelles sont habituellement le but des études physiopathologiques; nous nous occuperons uniquement des techniques "in vitro", lesquelles relèvent de la chimie biologique.

Si les expériences in vivo sont difficiles à interpréter, in vitro l'étude est plus facile et permet de fractionner le problème.

De très nombreuses préparations tissulaires sont capables d'incorporer. Elles peuvent être :

1°/- des systèmes cellulaires :

- coupes de tissus normaux (foie, rate, reins, pancréas),
- coupes de tissus cancéreux (lymphasarcome hépatoma),
- suspension de moelle osseuse,
- cellules isolées : hématies, réticulocytes, leucocytes normaux et pathologiques, cellule d'ascite de cancer Ehrlich.

2°/- des systèmes acellulaires : homogénats de tissus.

L'inconvénient des systèmes utilisant des cellules intacts réside dans le fait que les acides aminés pour être incorporés, doivent franchir la membrane cellulaire. Il en est de même pour les effecteurs nécessaires à cette synthèse. Or, la membrane cellulaire présente une perméabilité sélective dont l'effet peut être fâcheux pour des incorporations expérimentales. C'est en cela que les systèmes acellulaires (homogénats de tissus) sont intéressants. On élimine ainsi toute sélectivité pouvant provenir de la membrane cellulaire; mais ces avantages se doublent d'inconvénients, c'est-à-dire d'une diminution d'activité.

Ainsi, les homogénats de diaphragme incorporent, selon BORSOOK et Coll. cinq fois moins les acides aminés que le diaphragme entier.

Des expériences d'incorporation in vitro revèlent à SIEKEVITZ (58) que l'incorporation des protéines se réalise surtout au sein des microsomes; et cela

sous l'action des "enzymes pH5".

La plupart des auteurs s'attachèrent donc, dès lors, à purifier les systèmes d'incorporation et en extraire les constituants actifs.

B - EXPOSE DES DIVERSES TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT CELLULAIRE en vue de l'extraction de l'enzyme pH5 et de la séparation des microsomes.

1°/- Considérations générales : les diverses méthodes respectent les principes généraux suivants:

- thermolabilité de l'enzyme pH5,
- fractionnement sélectif des éléments cellulaires par ultra-centrifugation.

C'est pourquoi toutes les méthodes de préparation se feront

. sans interrompre une chaîne de froid de l'ordre de 0 à - 5°,
. et en opérant les centrifugations dans des centrifugeuses réfrigérées.

Les techniques varieront sur des questions de milieux d'extraction de mode opératoire, de vitesses de centrifugation, et de pureté plus ou moins grande des substances recueillies.

2°/- Processus général du fractionnement cellulaire : les opérations se dérouleront dans l'ordre suivant:

- choix et sacrifice de l'animal, excission du tissu et lavage éventuel de l'organe excisé,
- homogénéisation du tissu, laquelle requiert souvent la présence de milieux appropriés,
- centrifugations successives ayant pour but de fractionner les constituants cellulaires,
- précipitation de l'enzyme pH5.

a)- Le choix de l'animal :

. La plupart des homogénats de foie sont réalisés avec des foies de rats. Nous avons réalisé des incorporations avec des systèmes extraits de foie de cobaye et de lapin, mais les incorporations sont inférieures.

Toujours pour des questions de rendement, les auteurs ont été amenés à choisir les rats Wistar jeunes (69 - 44) et du sexe mâle. HOAGLAND

utilise des rats Wistar jeunes qu'il sacrifie après les avoir fatigués (27). Le poids des rats utilisés varie de 100g. (27) à 300g. (44). Leur âge varie de 20 à 30 jours (22) à 3 mois (69).

. Les auteurs sont unanimes pour admettre un sacrifice rapide, avec décapitation qui permet à l'animal de se vider rapidement de se vider rapidement de son sang. Le foie doit être rapidement excisé; il peut être lavé par perfusion de CIK (49) ou tout simplement découpé avec des ciseaux glacés et plongé dans un milieu de lavage glacé.

b)- L'homogénéisation : l'homogénéisation peut se réaliser dans des homogénéiseurs de Potter et Elvehjen (53) ou semi-micro-Waring. L'homogénéisation correcte est très importante selon BUCHER (9) et les auteurs fixent les normes des homogénéiseurs.

ZAMENICK et KELLER (69) utilisent des homogénéiseurs de Potter et Elvehjen dont la différence de diamètre entre le pilon intérieur et le corps de l'homogénéiseur est de 0,6mm de diamètre. LITTLEFIELD (43) préfère 2mm de différence.

. Les milieux d'homogénéisation sont très importants; KELLER et ZAMENICK ont beaucoup étudié leur influence et après plusieurs modifications, sont arrivés à un milieu qu'ils estiment le plus valable à base de chlorure de potassium et de magnésium et, surtout de saccharose.
La plupart des auteurs utilisent des milieux à base de saccharose (33 - 44 - 49 - 56 - 62 - 68 - 69). D'autres emploient des milieux simplifiés à base uniquement de chlorure de potassium (27) ou de chlorure de magnésium (61).

Certains auteurs tamponnent leurs milieux d'homogénéisation aux phosphates de potassium (35 - 68 - 69) ou avec le tampon Tris (62 - 49).

c)- Les centrifugations :

. Les vitesses de centrifugation sont calculées en fonction de la composition des milieux au sein desquels sont dilués les homogénats.
SCHEIDER et HAGEBOOM donnent différentes études de vitesses de centrifugation dans le but de séparer les éléments cellulaires; et cela, en fonction des concentrations en saccharose des milieux de dilution. Plus le milieu est concentré

donc dense, plus il faut une vitesse de centrifugation élevée.

Les noyaux cellulaires, les cellules non brisées, les pulpes cellulaires sédimentent les premiers; à faible vitesse de l'ordre de 400 à 2.000g. suivant la densité du milieu.

Les mitochondries sont éliminées par des centrifugations de 5 à 30.000g.

Les microsomes sédimentent de 60 à 130.000g.

d)- La précipitation des enzymes d'incorporation : se réalisera par l'addition d'acide acétique N jusqu'à pH5 et la majorité des auteurs suivent en cela la méthode de KELLER-ZAMENICK (25 - 69), HOAGLAND précipite par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N (27).

C - LES PRINCIPALES METHODES D'INCORPORATION IN VITRO A L'AIDE DES FRACTIONS CELLULAIRES -

1°/- Composition des milieux d'incubation :

a)- Les acides aminés à incorporer sont des acides (54 bis) marqués. Les incubations pourront se réaliser avec un ou plusieurs acides aminés marqués; leurs incorporations étant additives à faible concentration.

b)- Le milieu d'incubation sera isotonique. Et cela, par la présence d'ions Na^+ K^+ Ca^{++} Mg^{++} Cl^- SO_4^{--}.

c)- La présence de bicarbonate formera, en présence de gaz carbonique, un système tampon s'opposant aux variations de pH du milieu.

d)- Les effecteurs seraient ATP et GTP: effecteurs énergétiques, principalement nécessaires dans les homogénats; ces substances étant souvent en quantité suffisantes dans le système à base de cellules intactes; et en atmosphère anaérobie, la présence d'acide phosphoénol pyruvique et de kinase pyruvique, métabolites intermédiaires.

e)- Toutes les substances nécessaires aux incorporations sont contenues dans des volumes variant de 1ml à 2ml (TAKANAMI, GROSSI, MOLDAVE,

KELLER, ZAMENICK , HOAGLAND, mais dépassent rarement 2ml.

2°/- Conditions d'ambiance:

a)- Les incubations pourront se réaliser en atmosphère aérobie (mélange d'oxygène et de gaz carbonique) ou anaérobie (azote et gaz carbonique). Les atmosphères anaérobies ont l'avantage d'éviter le "vieillissement" rapide des préparations au cours d'une même incubation.

HÜLSMANN et LIPMANN (32) ont montré la conservation de l'activité des préparations sous azote. Leurs résultats sont particulièrement significatifs puisqu'une préparation laissée 30' à 30° à l'air incorpore 110cpm/mg, alors que la même préparation "non vieillie" incorpore 649cpm/mg et "vieillie sous azote" 533cpm/mg.

b)- Les réactions enzymatiques peuvent se réaliser à des températures de 37° (33 - 69 - 68 - 44 - 61 - 62 - 58) ou 37°5 MOLDAVE et WEINER, ou 27°5 (48) ou 38°5 ou 35° (16 - 49 - 56).

c)- Suivant la température, les temps varieront de 10' à 60'.

D - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA PREPARATION :

1°/- L'arrêt des réactions enzymatique se réalise la plupart du temps en précipitant les protéines des mixtures d'incubation par de l'acide perchlorique glacé 0,5 N (LITTLEFIELD) ou trichloracétique à 10 % (SIEKEVITZ). Seules les protéines sont ainsi précipitées; mais, il importe alors d'éliminer parfaitement les acides aminés marqués et les ribonucléoprotéines.

2°/- Lavage du précipité :

Le lavage du précipité doit être soigneusement fait; il s'opèrera par des solutions d'acide dilué pour éliminer les acides marqués.

Les solvants organiques élimineront les graisses.

3°/- Mesure de la radioactivité :

Les précipités seront étalés sur des rondelles de papier filtre, pesés et comptés au compteur Geiger à gaz. En tenant compte de l'absorption par le précipité du rayonnement émis par le C 14, c'est-à-dire de la "self-absorption",

on évalue la quantité de protéines synthétisées en mesurant le nombre de coups par minute et par milligramme de protéines.

- CHAPITRE III -

Parmi cet aperçu général des diverses façons d'extraire les enzymes d'incuber et de mesurer la qualité de l'incorporation, nous avons mis au point en détail une technique de préparation de l'enzyme pH5 utilisant les milieux d'homogénéisation de KELLER et ZAMENICK, lesquels ont été durant plusieurs années complétés et remaniés par leurs auteurs, cela en fonction des enseignements acquis par leurs recherches.

Notre but n'est pas ici de présenter la technique la plus récente, aux rendements les meilleurs; mais de décrire en détail une technique simple, dont le rendement est très acceptable; dont les résultats sont parfaitement reproductibles. Elle permet la comparaison entre des milieux simples et des milieux additionnés d'effecteurs.

A - TECHNIQUES UTILISEES :

1°/- Extraction de l'enzyme pH5 et des microsomes:

- Milieu A : $Mg\ Cl_2$ 0,004 M
  Tampon au phosphate de potassium pH7,8 0,025 M
  $CO_3\ HK$ 0,035 M
  K Cl 0,025 M
  Saccharose 0,35 M

- Milieu B : $Mg\ Cl_2$ 0,004 M
  K Cl 0,025 M
  Saccharose 0,9 M

- Milieu C : K Cl 0,15 M

- Acide acétique N

NB : - Les milieux A et B doivent être conservés à la glacière et renouvelés fréquemment.
- Tous les milieux doivent être placés à la glacière avant l'emploi.

Tampon au phosphate de potassium pH7,8 :

$PO_4\ H_2\ K$ 3,40g

$PO_4\ H\ Na_2$ 3,55g

eau distillée privée de CO_2 : QSP 1000ml

Le phosphate disodique doit être pesé à l'air après passage à l'étuve à 110-130 2H.

2°/- Matériel nécessaire :

- 1 centrifugeuse réfrigérée pouvant centrifuger à 30.000 g.
- 1 centrifugeuse réfrigérée pouvant centrifuger à 110.000 g.
- Homogénéiseur de Potter et Elvehjem
- Verrerie courante - électrophotomètre
- Table à dissection - pièce avec aération spéciale réservée à la manipulation des substances marquées.
- pH-mètre avec mesure du pH à distance (électrodes blindées).

3°/- Temps préalables:

a) - Préparer un cristallisoir rempli de glace fondante à laquelle on ajoute du "gros sel",

b)- Placer dans ce cristallisoir :

- 1 flacon contenant du milieu A dans lequel plonge une pipette de 10ml à écoulement total,
- 1 flacon de milieu C (Cl K 0,15 M) et 1 bécher de 125ml contenant une trentaine de ml de milieu C,
- 1 homogénéiseur de Potter et Elvehjem,
- 4 tubes à centrifuger adaptés à la centrifugeuse Servall.

c)- Tarer le bécher et son contenu et laisser la tare sur la balance.

4°/- Sacrifice de l'animal et homogénéisation :

Les rats utilisés sont des rats Wistar âgés de 2 à 3 mois.

La race Wistar ne semble pas être indispensable, mais pour des questions de rendement, il est préférable d'utiliser les rats jeunes.

Assomer le Rat, trancher la tête, saigner le Rat, ouvrir rapidement l'abdomen. Exciser rapidement le foie.

Placer le foie dans le bécher rempli de milieu C, et le peser (une approximation de l'ordre du 1/2 gramme est bien suffisante). Un foie de rat pèse autour de 10g.

Découper le foie avec des ciseaux au sein même du milieu C.

Agiter pour laver le foie - décanter.

Renouveler le milieu C de lavage.

Placer le foie dans l'homogénéiseur.

Ajouter 2, 3 volumes de milieu A.

Homogénéiser rapidement (15 à 20 secondes au maximum).

L'opérateur devra pendre la précaution indispensable, si l'homogénéiseur est en verre et non en métal, de se munir de lunettes protectrices contre les éclats de verre dûs au bris de l'appareil.

Au cas où, pour des raisons de puissance du moteur d'entraînement de l'homogénéiseur ou de capacité de ce dernier, l'homogénéisation durerait plus de 20 secondes, il est préférable d'homogénéiser en plusieurs fois, afin d'éviter un échauffement néfaste aux enzymes.

Verser l'homogénat dans les tubes à centrifuger. Equilibrer rapidement les tubes.

5°/- Centrifugations :

- Première centrifugation : centrifugeuse Servall. Cette centrifugeuse est réfrigérée.

Centrifuger à 15.000g. pendant 10 minutes.

Pendant ce temps vérifier qu'à la glacière se trouve le milieu B, une éprouvette de 125ml, une pipette de 10ml à écoulement total, 1 seringue de gros

volume avec une aiguille et 1 tube de polytène de 15cm pouvant s'adapter à la seringue.

- Pipeter le surnageant de centrifugation dans les 4 tubes, en laissant 1ml environ de surnageant au-dessus des culots contenant les débris cellulaires et les mitochondries; cela enfin de ne pas poluer le surnageant.

Verser les surnageants dans l'éprouvette glacée.

Mesurer le volume obtenu.

Diluer avec trois volumes de milieu B.

Aspirer le liquide avec la seringue en utilisant le tube en polytène qui permet de pipeter dans l'éprouvette.

Ajuster alors l'aiguille à la place du tube de polytène.

Injecter dans les tubes spéciaux de l'ultracentrifugeuse le liquide à centrifuger.

Centrifuger une heure à 105.000g (40.000 t/minute pour une centrifugeuse Martin-Christ - Rotor vert).

Pendant le temps de centrifugation, faire chauffer le pH-mètre; préparer le milieu tampon, prévoir un cristallisoir rempli de glace fondante dans lequel plongent 2 béchers numérotés 1 et 2 de 125ml; on place le tout sur un agitateur magnétique.

- Après la centrifugation, on pipette le surnageant contenant les enzymes jusqu'à 1 cm environ du culot de microsomes. On place tous les liquides pipetés dans le bécher n° 1 maintenu dans la glace fondante. Décanter les tubes à centrifuger; essuyer leurs parois avec de la gaze ou de papier filtre; placer les tubes dans le givreur du réfrigérateur.

6°/- Précipitation de l'enzyme pH5 :

- Etalonnage du pH-mètre à l'aide du milieu tampon que l'on place dans le bécher n° 2 de 125ml (vu plus haut).

- Mettre en route l'agitateur magnétique

- Mesurer le pH du liquide contenu dans le bécher n° 1

Ajouter goutte à goutte de l'acide acétique N; suivre la chute du pH à l'aide du pH-mètre.

Arrêter l'addition de l'acide à pH5

- Centrifuger la suspension d'enzyme pH5 dans la centrifugeuse réfrigérée à une température inférieure à 0°, cela pendant 10 minutes à 15 ou 20.000g.

- Le culot contient "l'enzyme pH5"

- Décanter par renversement

- Remettre en suspension le culot dans du milieu B enfin de laver le culot.

- Centrifuger à nouveau dans les mêmes conditions

- Décanter par renversement; essuyer les parois des tubes à centrifuger

A ce stade la préparation peut être interrompue jusqu'au lendemain et les tubes d'enzymes placés à la glacière; en effet, compte tenu des temps des quatre centrifugations, des temps d'arrêt des centrifugeuses, et des manipulations, il est parfois intéressant de ne poursuivre la préparation que le lendemain.

7°/- Reprise des culots d'enzyme pH5 et de microsomes :

Chaque culot d'enzyme pH5 est repris par 1ml de milieu A glacé, agité avec une pipette Pasteur, vidé dans un homogénéiseur de Potter et Elvehjem de petit calibre; lequel est maintenu dans un bain de glace; 1ml de milieu A sert à rincer tous les tubes, puis on le verse à nouveau dans l'homogénéiseur.

Puis on réalise l'homogénéisation et on obtient une très fine suspension. On opère de la même façon pour les culots de microsomes.

On pratique alors un dosage des protéines à l'aide de la méthode de Gornall à partir de 0,1ml de fine suspension; auxquels on ajoute 1,9ml de sérum physiologique et 8ml de Rf. de Gornall.

Ce premier dosage de protéines a de fortes chances d'être approximatif.

En effet, on a alors des concentrations de l'ordre de 5 à 10mg de protéines dans la prise d'essai ce qui nous place dans la zone peu sensible du

dosage des protéines par la méthode de Gornall.

Néanmoins, ce dosage approximatif permet de trouver une dilution qui nous placera dans les doses de 1 à 3mg de protéines dans la prise d'essai, concentrations pour lesquelles le dosage des protéines obtient sa précision la plus grande et pour lesquelles on obtient une solution limpide d'enzyme et de microsomes.

En fonction de ce dosage, on dilue avec du milieu A les liqueurs d'enzyme et de microsomes de façon à avoir respectivement 8 à 20mg de protéines par ml.

Les solutions sont alors placées dans le givreur de la glacière et se conservent plusieurs semaines.

B - REALISATION DE L'INCUBATION

1°/- Réactifs :

- Suspension de microsomes
- Solution d'enzyme pH5
- Solution d'acide aminé marqué à une micromole /ml
- Solution de kinase pyruvique à 0,2 mg/ml pour 1ml
- Suspension phosphoénol pyruvate de baryum et d'argent
- Solution d'ATP à 10 micromoles/ml
- Solution de GTP à 2,5 micromoles/ml
- Potasse N/10

Une bouteille d'un mélange de 5 % de gaz carbonique et 95 % d'azote

2°/- Matériel :

Dans une pièce réservée aux manipulations de radio isotopes, un bain-marie réglable à 37 ° avec arrivée du mélange gazeux jusqu'au milieu des tubes par l'intermédiaire de robinets de verre.

Un poste de manipulation de l'acide aminé marqué

des vêtements de protection.

3°/- Technique opératoire :

Dans des tubes à centrifuger coniques, verser :

- 0,1 ml de solution de phosphoénol pyruvate - de baryum et d'argent - soit 10 micromoles,
- 0,1 ml de KOH N/10,
- 0,3 ml de suspension de microsomes,
- 0,2 ml de solution d'enzyme pH5,
- 0,1 ml de solution de kinase pyruvique (soit 0,02 mg),
- 0,1 ml de solution d'ATP (soit 1 micromole),
- 0,1 ml de solution de GTP (soit 0,25 micromole).

Passer alors dans la pièce réservée aux radio isotopes et verser dans chaque tube à l'aide du poste de manipulation 0,1 ml de la solution de leucine marquée.

Agiter.

Mettre le tube au bain-marie à 37° - déclancher le chronomètre, ouvrir le passage du mélange gazeux à raison de deux litres par minute.

C - ARRET DE L'INCUBATION ET TRAITEMENT DU PRECIPITE -

1°/- Réactifs :

- Acide trichloracétique à 10 %,
- Acide trichloracétique à 4 %,
- Alcool à 95 °,
- Réactif avec : éther deux parties,
  alcool deux parties,
  chloroforme une partie,
- Acétone.

2°/- Matériel :

- Centrifugeuse,
- Bain-marie réglable à 90°,
- Verrerie courante.

3°/- Technique opératoire :

Nous utilisons ici la technique de SIEKEVITZ (58).

Après 10 minutes de bain-marie, arrêt de l'incubation par acide trichloracétique à 10 % : 1 ml.

Centrifugation à 3.000 tours - décantation.

Premier lavage du précipité par 1 ml d'acide trichloracétique à 4 %.

Remise en suspension.

Centrifugation - décantation.

Faire un deuxième lavage identique au premier.

Puis remettre en suspension le précipité dans 1,5 ml d'acide trichloracétique à 4 %. Placer 15 minutes dans un bain-marie à 90° afin d'éliminer les acides ribonucléiques.

Centrifuger.

Opérer 1 lavage avec 1 ml d'alcool à 95 %
2 lavages avec 1ml de réactif composé d'éther-alcool-chloroforme
1 lavage avec 1 ml d'éther

Il est préférable de ne pas utiliser les réactifs de lavage en quantités supérieures à 1 ml, car le précipité arrive à coller aux parois du tube, cela occasionnant des pertes.

Sèchage à l'air du précipité.

D - MESURE DE LA RADIOACTIVITE -

Le précipité une fois sec est remis en suspension dans 15 ml d'acétone, homogénéisé dans un homogénéiseur de Potter et Elvehjem réservé à cet usage, et versé sur une rondelle de papier Whatman placée dans un filtre spécial en nylon assez proche d'un filtre de Büchner. La filtration se fait avec une faible aspiration par trompe à vide pour obtenir un dépôt aussi homogène que possible.

Sèchage à l'air du précipité.

La rondelle de papier filtre ayant été tarée au préalable, une simple pesée donne le poids du précipité.

Puis la radioactivité émise par le précipité est mesurée au compteur Geiger-

Müller à fenêtre et à courant gazeux.

Les résultats sont exprimés en coups/minute/milligramme de protéine après correction de self-absorption. Il est donc intéressant de remarquer que même si l'on perd de la substance lors des lavages, cela n'a pas une très grande importance, puisque l'on rapporte les résultats au mg de protéines.

La méthode que nous venons de développer ici est parfaitement reproductible et peut être un excellent outil pour tester tel ou tel effecteur éventuel de la biosynthèse protéique in vitro.

C'est ce que nous allons montrer dans la quatrième partie consacrée à l'étude de la méthode et aux résultats obtenus.

- CHAPITRE IV -

A - ETUDE CRITIQUE DE LA METHODE ET DES RESULTATS OBTENUS -

1°/- Première série d'expériences : effets de l'incubation au bain-marie à 37°.

Nous avons traité des précipités obtenus à partir d'une même mixture obtenue en mélangeant les produits nécessaires à l'incorporation selon la technique décrite précédemment.

Un premier lot de tubes ne fut pas incubé, mais conservé à la glace.

Le deuxième lot fut mis à incuber 10 minutes à 37°.

La suite de la technique fut appliquée identiquement et simultanément pour les deux séries d'échantillons.

/RESULTATS /:

- Témoins non incubés : moyenne de 11 coups/minute/mg
- Témoins incubés : moyenne de 94 coups/minute/mg

Cela montre donc parfaitement la réalité de l'incorporation et élimine l'idée que les acides aminés marqués pourraient être adsorbés sur les protéines introduites par les nzymes et les microsomes.

2°/- La deuxième série d'expériences : eut pour but l'amélioration du rendement. En effet, l'acide phosphoénol pyruvique nous est livré en raison de son instabilité sous forme de sel double d'argent et de baryum, lequel est insoluble.

Trois lots de tubes furent réalisés:

a)- Premier lot avec le phosphoénol pyruvate tel quel: 110 cpm/mg

b)- Deuxième lot avec addition d'une goutte de potasse concentrée: moyenne de 238 cpm/mg

c)- Troisième lot avec addition de 0,1 ml de solution acqueuse saturée de chlorure de potassium et 0,1 ml de solution acqueuse saturée de sulfate

acide de potassium :

- incorporation moyenne de 146 cpm/mg.

Ce troisième lot fut réalisé dans le but de provoquer une réaction de double décomposition avec production de sulfate de baryum, chlorure d'argent, et phosphoénol pyruvate de potassium. Les meilleurs résultats furent donc obtenus avec l'addition de potasse.

3°/- Diverses concentrations en potasse furent essayées :

KOH concentrée 3N	: 0,1 ml	221 cpm/mg
KOH N/1	: 0,1 ml	256 cpm/mg
KOH N/10	: 0,1 ml	196 cpm/mg
KOH N/50	: 0,1 ml	188 cpm/mg
KOH N/100	: 0,1 ml	152 cpm/mg

Dès lors toutes les incubations furent réalisées avec l'addition de o,1 ml de potasse N/1.

4°/- Thermolabilité des enzymes :

Deux lots furent traités simultanément; le premier fut constitué par trois témoins avec composition habituelle, c'est-à-dire avec KOH N/1.

Le deuxième fut composé de trois témoins identiques mais traités par 15 minutes de bain-marie bouillant.

/RESULTATS/ :

Série normale	233 cpm/mg
Série chauffée	16 cpm/mg

Le passage au bain-marie pendant un quart d'heure détruit donc totalement les enzymes, l'incorporation des acides aminés est nulle.

5°/- Action de l'acide trichoracétique à 90° sur le précipité de protéines.

Nous avons vu précédemment que le précipité de protéines est soumis à l'action de l'acide trichloracétique durant 15 minutes dans le but d'éliminer les acides ribonucléiques.

Des expériences furent réalisées dans le but de vérifier cela:

. Série de témoins normaux : 124 cpm/mg

. Série de témoins non soumis à l'action de l'acide trichloracétique : 175 cpm/mg.

Il semble donc que l'acide trichloracétique élimine du milieu les acides ribonucléiques.

6°/- Incorporation en fonction du temps d'incubation au bain-marie à 37°:

Au-delà de 10 minutes de bain-marie, le temps n'influe plus sur l'incorporation.

/RESULTATS/ :

- Bain-marie pendant	10 minutes	: 294 cpm/mg	de protéines
	20 "	: 272 cpm/mg	" "
	30 "	: 303 cpm/mg	" "
	40 "	: 287 cpm/mg	" "

N B - Il est a remarquer que dans les différentes séries d'expériences mentionnées ci-dessus, les témoins normaux d'incubation donnent des taux d'incorporation sensiblement différents; cela tient au fait que chaque lot nouveau d'enzyme pH5 et de microsomes n'a pas les mêmes qualités que le précédent.

Nous pouvons interpréter cela comme la conséquence de préparations non rigoureusement identiques, soit en raison de temps d'homogénéisation quelque peu différents, ou du réchauffement de la préparation, ou encore du fait que les foies de rats n'ont pas les mêmes qualités, ou enfin que des altérations des enzymes ou des microsomes ont été infligées par la conservation à la glacière.

C'est pourquoi il est indispensable de faire au moins trois témoins normaux lors de chaque série d'expériences.

7°/- Conservation des préparations d'enzymes à la glacière :

Des essais réalisés avec le même lot d'enzymes et de microsomes après 18 jours de conservation à la glacière donnèrent les résultats suivants:

- Préparations fraîches : 238 cpm/mg de protéine
- Préparations de 15 jours : 187 cpm/mg de protéine.

Nous enregistrons donc une baisse d'activité de l'ordre de 21 %.

Ce même lot d'enzymes et microsomes fut conservé 6 mois dans le givreur du réfrigérateur. Au bout de cette période, l'incorporation moyenne était encore de 120 cpm/mg.

8°/- Effets de la lyophylisation :

Comme il n'est pas très pratique d'avoir à préparer tous les 15 jours enzymes et microsomes, nous avons vérifié l'action de ce procédé de conservation: qui pourrait permettre leur préparation en grandes quantités.

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet immédiat de la lyophylisation.

Ce procédé n'altère absolument pas les préparations.

Les résultats furent similaires: 294 et 296 cpm/mg pour la moyenne des deux lots.

Pour étudier la conservation de l'activité des préparations lyophylisées, nous avons opéré sur ce même lot d'enzymes et de microsomes que nous avons divisé en deux parties.

La première partie d'enzymes et de microsomes fut conservée à la glacière, la deuxième partie fut lyophilisée.

Au bout de huit mois nous avons enregistré les résultats suivants:

- Incubation à l'aide des préparations lyophylisées :
  moyenne de 198 cpm/mg
- Incubation à l'aide des préparations conservées à - 5° :
  moyenne de 130 cpm/mg.

Les préparations lyophylisées semblent donc être plus actives que celles conservées sans préparations spéciales, mais moins actives que des préparations fraîches.

B - UTILISATION DE LA METHODE POUR TESTER L'ACTIVITE DE TROIS SUBSTANCES :

Comme nous pouvons le constater, toutes les expériences réalisées ci-dessus ont eu pour but d'étudier les conditions optima de la technique utilisée et l'importance des différents facteurs d'incorporation.

Nous avons pu constater que cette technique était parfaitement reproductible d'un jour à l'autre et même d'une quinzaine à l'autre.
Il est donc parfaitement possible de tester les substances dont on veut connaître l'action sur la biosynthèse des protéines; c'est ce que nous nous proposons de montrer dans les séries d'expériences ci-après.

1°/- La thyroxine :

provoque in vivo une augmentation de la rétention azotée chez les jeunes rats, ainsi qu'une perte de poids due probablement à une augmentation du catabolisme des substances non protéiques.

In vitro, nous n'avons pas constaté d'action véritablement stimulante de la biosynthèse protéique.

- Témoins : 360 cpm/mg
- Témoins + 1 micromole de thyroxine (contenue dans 0,1 ml) : 352 cpm/mg

2°/- Phosphate de Pyridoxal :

Nous n'avons constaté aucune action du phosphate de pyridoxal in vitro.

- Témoins : 340 cpm/mg
- Témoins + phosphate de pyridoxal : 329 cpm/mg

Cela confirme l'opinion de LICHSTEIN selon laquelle le phosphate de pyridoxal favorise la pénétration des acides aminés dans la cellule et non les temps ultérieurs de la biogenèse.

En effet, d'après cette hypothèse, comme nous utilisons des systèmes acellulaires pour l'incorporation des acides aminés, il est tout à fait logique que nous ne notions pas l'amélioration du rendement.

NB : le phosphate de pyridoxal a été utilisé aux concentrations de 0,10 mg pour o,10 ml.

3°/- Le glutathion :

Le glutathion fut utilisé aux concentrations de 1 micromole pour 0,1 ml.

Deux séries d'expériences furent réalisées; dont nous donnons dans les tableaux ci-dessous les résultats en leur appliquant le test "t" de STUDENT-FISHER

TEST "t" DE DIFFERENCE ENTRE MOYENNES (1)

DONNEES :

T E M O I N S	GLUTATHION
104	182
121	183
145	235

TEMOINS	CARRES	GLUTATHION	CARRES
104	10.816	182	33.124
121	14.641	183	33.489
145	21.025	235	55.225
370	46.482	600	121.838

Moyennes : 370/3 = 123,63 - 600/3 = 200

$S x^2$: 46.482 - 121.838

$\frac{[S x]^2}{n}$: 45.633,33 - 120.000

$S x^2$ 748,67 - 1.838

$$S^2 d = (748,67 + 1.838) \frac{3 + 3}{3.3(3 + 3 - 2)} = 431,11$$

$$t = \frac{1.263 - 200}{\sqrt{431,11}} = - 3,68$$

Degré de liberté 4 $\begin{cases} P = 0,05 ; t\ 0,05 = 2,78 \\ P = 0,01 ; t\ 0,01 = 4,60 \end{cases}$

Différence significative au niveau de P = 0,05

TEST "t" DE DIFFERENCE ENTRE MOYENNES (2)

DONNEES

T E M O I N S	GLUTATHION
594	710
590	735
620	752
636	792
636	794

TEMOINS	CARRES	GLUTATHION	CARRES
494	244.036	710	504.100
590	348.100	735	540.225
620	384.400	752	565.504
636	404.490	792	627.264
636	404.490	794	630.436
2.976	1.785.516	3.783	2.867.529

Moyennes : 2.976/5 = 595,2 - 3.783/5 = 756,6

$S x^2$: 1.785.516 - 2.867.529

$\frac{[S x]^2}{n}$: 1.771.315,2 - 2.862.217,8

$S x^2$: 0.014.200,8 - 0,005.311,2

$$S^2 d = (14.200,8 + 5.311,2) \frac{5 + 5}{5 \times 5 (5 + 5 - 2)} = 975,6$$

$$t = \frac{595,2 - 756,6}{\sqrt{975,6}} = - 5,16$$

Degré de liberté : 8

P = 0,05 ; t 0,05 = 2,31
P = 0,01 ; t 0,01 = 3,36

Différence significative au niveau de P = 0,01

La différence des moyennes étudié par le Test "t" de STUDENT-FISHER est :

- pour la première série de mesure (1) significative au niveau du seuil de probabilité P = 0,05 (t 0,05 = 2,78)
- pour la deuxième série de mesure (2) significative au niveau du seuil de probabilité P = 0,01 (t 0,01 = 3,36)

Nous pouvons donc conclure que le glutathion favorise l'incorporation in vitro des acides aminés dans les protéines.

- C O N C L U S I O N S -

Ce travail comporte deux parties :

1°/- Dans la première partie, nous recherchons une technique valable pour l'incorporation in vitro des acides aminés radioactifs dans les protéines.

Après avoir adopté la technique de KELLER et ZAMENICK, nous avons cherché les conditions optima de sa réalisation dans le but d'en faire un test de l'activité de certaines substances sur la biosynthèse des protéines.

2°/- Dans la deuxième partie, nous avons essayé trois substances qui sont : la thyroxine, le glutathion et le phosphate de pyridoxal.

Le Président de la Thèse :

Professeur ENSELME,

VU, le Doyen :

H. HERMANN,

VU et permis d'imprimer
LYON, le 25 Septembre 1962
Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS,

- B I B L I O G R A P H I E -

1 - BELJANSKI (M.).- Protein Biosynthesis by a cell free bacterial system.- Biochem. Biophys. Acta (Pays-Bas), 1960, 141 (1.) 104-110.

2 - BELJANSKI (M.).- Identification des quatre kinases spécifiques des diphospho nucléosides dans une préparation enzymatique d'origine bactérienne.- C.R. Acad. Sci., 1959, 248, 1146-1148.

3 - BELJANSKI (M.).- Synthèse des peptides par un système enzymatique en présence de nucléosides triphosphate.- C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 624-626.

4 - BELJANSKI (M.) and OCHOA (S.).- Protein Synthesis by a cell free bacterial system.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1958, 44, 494-499.

5 - BELJANSKI (M.) and OCHOA (S.).- Protein biosynthesis by a bacterial cell free system. II. Further Study on the amino acid incorporation enzyme.- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1958, 44, 1157-1157

6 - BERG (P.).- The chemical synthesis of amino-acyl adenylates.- J. biol. Chem., 1958, 233, 608-611.

7 - BERG (P.).- Specificity in protein synthesis.- Ann. Rev. Biochem., 1961, 30, 293-324.

8 - BISHOP (J.O) and SCHWEET (R.S.).- Role of glutathione in transfer of amino acids from amino acyl-ribonucleic acid to ribosomes. Biochem. Biophys. Acta (Pays-Bas), 1961, 49, (1), 235-236.

9 - BUCHER (N.LR.).- The formation of radioactive cholesterol and fatty acids from C 14 labeled acetate by rat liver homogenates.- J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 498-498.

10 - COHEN (G.N.) and GROSS (F.).- Protein biosynthesis .- Ann. Rev. Biochem., 1960, 29, 525-546.

11 - COHEN (G.N.) and HIRSCH (M.L.).- Studies of biosynthesis in Escherichia Coli.- Biochem. J., 1952, 52, 25-29.

12 - COHEN (G.N.) et RICKENBERG (H.V.).- Existence d'accepteurs spécifiques pour les acides aminés chez Escherichia Coli. -
C.R. Acad. Sci., 1955, 240, 2086-2088.

13 - Mc CORQUODALE (D.J.) and MUELLER (G.C.).- Protein biosynthesis.-
Arch. Biochem. Biophys., 1958, 77, 13-16.

14 - CRICK (F.H.C.).- On the structure of nucleic-acids and their role in protein synthesis.-
Cambridge University Press, London, 1957.

15 - DAVIE (E.W.), KONINGS BERGER (V.V) and LIPMANN (F.).- The isolation of a tryptophan activating enzyme from pancreas.-
Arch. Biochem. Biophys. 1956, 65, 21-26.

16 - DECKEN VON DER (A.), HULTIN (T.).- On the transfer of labeled AA from SRNA to purified RNP particles from rat liver microsomes.-
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 40, 187-189.

17 - DE MOSS (J.A.), GENUTH (S.N.) and NOVELLI (G.D.).-
Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.), 1956, 42, 325-330.

18 - FESSENDEN (J.M.) and MOLDAVE (K.).- Studies on amino-acyl transfer from soluble RNA to ribosomes; isolation of an additional transferring factor from the microsomal and soluble partion of cells.-
46th annual Meeting-Federation of american societies for experimental biolog 1962, P 1709.

19 - FLORINI (J.R.).- Incorporation of leucine C 14 into proteins by a cell free system from rat skeletal muscle.
46th annual Meeting-Federation of American societies for experimental Bidogy 1962, P. 2091, 412 D.

20 - GORNALL (A.G.), BARDAWILL (J.C.) ans DAVID (M.M).- Determination of serum protein by means of the biuret reaction.-
J. biol. Chem., 1949, 177, 751-766.

21 - GROSSI (L.G.) and MOLDAVE (K.).- Transfer of RNA-bound amino-acids to microsomal proteins.-
Biochem. Biophys. Acta, 1959, 35, 275-278.

22 - GROSSI (G.), and MOLDAVE (K.).- The effect of soluble factors on the transfer of amino-acids from soluble RNA to microsomal proteins.-
J. biol. Chem., 1960, 235, (8), 2370-75.

23 - HAGEBOOM (G.H), SCHNEIDER (W.C.) and PALADE (G.E.).- Isolation of intact mitochondria from rat liver, and sub-microscopic particulate material.-
J. biol. Chem., 1948, 172, 619-635.

24 - HARLYN (O.), HALVORSON.- The induced synthesis of proteins.-
Advanc. Enzymol (U.S.A.), 1960, 22, 99-156.

25 - HOAGLAND (M.B).- An enzymatic mecanism. for amino-acids activation in animal tissues.-
Biochem. Biophys. Acta, 1955, 16, 288-299.

26 - HOAGLAND (M.B.).- Enzymatic reactions between amino-acids and ribonucleic acids as intermediate steps in protein synthesis.-
IV th International Congress of Biochemistry Vienna 1-6 Sept. 1958 - Synposium n°8.

27 - HOAGLAND (M.B.) KELLER (E.B.) ZAMENICK (P.C.).- Enzymatic carboxyl activation of amino-acids.-
J. biol. Chem., 1956, 218, 345-358.

28 - HOAGLAND (M.B.), KELLER (E.B.) and ZAMENICK (P.C.).- Intermediate reactions in protein biosynthesis.-
Biochem. Biophys. Acta, 1957, 24, 215-216.

29 - HOAGLAND (M.B.), STEPHENSON (M.L.), SCOTT (J.F.), HECTH (L.) and ZAMENICK (P.C.).- A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.-
J. biol. Chem., 1958, 231, 241-257.

30 - HOAGLAND (M.B.), ZAMENICK (P.C.), SHARON (N.), LIPMANN (F.), STULBERG (M.P.) and BOYER (P.D.).- Oxygen transfer to AMP in the enzyme synthesis of the hydroxamate of tryptophan.-
Biochem. Biophys. Acta, 1957, 26, 215-217.

31 - HOTTA (Y.) and OSAWA (S.).- Further studies on nuclear and ribonucleic acids.-
Biochem. Biophys. Acta, 1959, 31, 570-572.

32 - HULSMANN (W.C.), LIPMANN (F.).- Amino-acids transfer from SRNA to microsome activation by -SH compounts.-
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 43, 123-125.

33 - KELLER (E.B.) and ZAMENICK (P.C.).- The effect of guanosine di phosphate and triphosphate on the incorporation of labeled amino-acids into proteins.
J. biol. Chem., 1956, 221, 45-49.

34 - KELLER (E.B.), ZAMENICK (P.C.) and LOFTFIELD (R.B.).- The role of microsomes in the incorporation of amino-acids into proteins.-
J. Histochem. Cytochem., 1954, 2 , 378-382.

35 - KOLTHOFF (I.M.), ELVING (P.J.).-
Treatise on anlytical chemistry - 1, p. 377.

36 - KRUH (J.).- La biosynthèse des proteines : aspect actuel du problème.
Rev. Franc. Etudes Clin. Biol., 1957, 2, (8), 820-856.

37 - KRUH (J.).- Biosynthèse des protéines. Nouveaux aspects du problème. Mécanismes cellulaire de la biosynthèse.-
Rev. Franc. Etudes Clin. Biol., 1960, 5, 82-95.

38 - LICHSTEIN (H.C.).- Vitamin b6 and protein synthesis.-
J. biol. Chem., 1956, 219, 27-29.

39 - LINGREL (J.B.).- An investigation of the later stages in protein biosynthesis.-
Dissert. Abstr. (U.S.A.), 1961, 21 (10), 2880-2881.

40 - LIPMANN (F.).- Metabolic generation and utilisation of phosphate bond energy.-
Advanc. Enzymol, 1941, 1, 99-158.

41 - LITTLEFIELD (J.W.) and KELLER (E.B.).- Incorporation of 14 C amino-acids into RNP particles from the ehrlich mouse ascites tumor.
J. biol. Chem., 1957, 224, 13-30.

42 - LIPMANN (F.) and TUTTLE (L.C.).- A specific method for the determination of acyl phosphate.-
J. biol. Chem. 1945, 159, 21-28.

43 - LITTLEFIELD (J.W.) and KELLER (E.B.).- Incorporation of 14 C amino-acids into ribonucléo protein particles from the ehrlich mouse ascites tumor.-
J. biol. Chem., 1957, 224, 13-30.

44 - LITTLEFIELD (J.W.), KELLER (E.B.), GROSS (J.) and ZAMENICK (P.C.).- Studies on cytoplasmic ribonucleic protein particles from the liver of the rat.-
J. biol. Chem., 1955, 217, 111-123.

45 - LOFTFIELD (R.B.).- Physico chemical aspects of protein biosynthesis.-
IV th International Congres of biochemistry Vienna - 1-6 Sept. 1958, Symposium n°8.

46 - MOLDAVE (K.).- Intracellular protein metabolism in ehrlich's ascites carcinoma cells.-
J. biol. Chem., 1959, 234, 841-848.

48 - MOLDAVE (K.) and WEINER (M.).- The labelling in vitro of intermediate in amino-acids incorporation.-
J. biol. Chem., 1960, 235, 2365-2370.

49 - MORGAN (W.S.), DECKEN VON DER (A.) and ULTIN (T.).- Amino-acids incorporation into interior protein sites, by purified rat liver systems.
Exper. Cell. Res. (U.S.A.), 1960, 20, 655-657.

50 - NATHANS (D.), LIPMANN (F.).- Amino-acids transfer from SRNA to microsomes isolation of a heat labile factor from liver supernatant.-
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 43, 126-129.

51 - PETERMAN (M.L.) and HAMILTON (M.G.).- The purification and properties of cytoplasmic ribonucléoproteins from rat liver.-
J. biol. Chem., 1957, 224, 725-736.

52 - PETERSON (E.) and GREENBERG (D.M.).- Charactéristics of the amino-acids incorporating system of liver homogenates.-
J. biol. Chem., 1952, 194, 359-375.

53 - POTTER (V.R.) and ELVEHJEM (C.A.).- A modified method for the study of tissues oxydations.-
J. biol. Chem., 1936, 114, 495-504.

54 - RAACKE (I.D.).- The synthesis of proteins.-
Metabolic Pathways. (Edited by Greenberg) Academic Press, 1961, 2, 263-388)

54 bis - RENDI (R.) and WARNER (R.C.).- Sites of intracellular incorporation of amino-acids in proteins.-
Ann. New-York Acad. Sci., 1960, 88, 741-744.

55 - ROODYN (D.B.), REIS (P.J.) and WORK (T.S.).- Protein synthesis in mitochondria. Requirements for the incorporation of radioactive amino-acids into mitochondrial protein.
Biochem. J. (G.B.), 1961, 80, 9-21.

56 - SACHS (H.).- A stabilized system for amino-acids incorporation.-
J. biol. Chem., 1957, 228, 23-39.

57 - SCHNEIDER (W.C.) and HOGEBOOM (G.H.).- Intracellular distribution of enzymes.-
J. biol. Chem., 1950, 183, 123-128.

58 - SIEKEVITZ (P.).- Uptake of radioactive alanine in vitro into the protein of rat liver fractions.-
J. biol. Chem., 1952, 195, 549-565.

59 - SINGER (M.F.) and CANTONI (G.L.).- Studies on soluble ribonucleic acid of rabbit liver. Terminal groups and nucléotide composition.-
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 39, 182-183.

60 - STRAUB (F.B.) ULMANN (A.) and VENTIANER (P.).- Ribonucleic acid and the formation of amylase in cell free preparations from pigeon pancreas.-
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 43, 152-162.

61 - TAKANAMI (M.).- A stable ribonucleoprotein for amino-acids incorporations.-
Biochem. Biophys. Acta, 1960, 39, 318-326.

62 - TAKANAMI (M.) and OKAMOTO (T.).- Isolation of an enzyme catalyzing the transfer of amino-acids from soluble RNA to microsomal ribonucleoprotein.- Biochem. Biophys. Acta (Pays-Bas), 1960, 47, n°2, 379-381.

63 - WONG (K.K.) and MOLDAVE (K.).- Enzymatic participation of enz-bond amino acyl adenylates in amino-acids incorporation into proteins.- J. biol. Chem., 1960, 235, 694-699.

64 - ZALTA (J.P.).- Méthode d'études des stades de l'incorporation des acides aminés dans les microsomes du foie de rat. C.R. Acad. Sci., 1958, 247, 1143-1145.

65 - ZALTA (J.P.).- Nouveau système d'incorporation des acides aminés isolés des microsomes du foie de rat. C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 4058-4060.

66 - ZALTA (J.P.) et BELJANSKI (M.).- Synthèse de peptides par des fractions subcellulaires préparées à partir du foie de rat. C.R. Acad. Sci., 1961, 253, (3) , 567-579.

67 - ZALTA (J.P.) et KHOUVINE (Y.).- Présence d'un système enzymatique lié aux microsomes du foie de rat, permettant l'incorporation des acides aminés. C.R. Acad. Sci, 1959, 248, 1443-1445.

68 - ZAMENICK (P.C.).- Incorporation of radioactivity from DL leucine 14 C into protein of rat liver homogenates.- Fed. Proc., 1953, 45, 295-295.

69 - ZAMENICK (P.C.) and KELLER (E.B.).- Relation between phosphate energy donors and incoroporation of labeled amino acids into proteins.- J. biol. Chem., 1954, 209, 337-354.

- TABLE DES MATIERES -

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I 2

CHAPITRE II..... 16

CHAPITRE III..... 22

CHAPITRE IV..... 32

CONCLUSIONS..... 40

BIBLIOGRAPHIE..... 41